

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



AUSGEGEBEN AM
24. JANUAR 1957

DEUTSCHES PATENTAMT

PATENTSCHRIFT

Nr. 956 952

KLASSE 120 GRUPPE 2502

INTERNAT. KLASSE C 07c

C 9818 IV b / 120

Dr. Albert Wettstein und Dr. Ernst Vischer, Basel (Schweiz)
sind als Erfinder genannt worden

CIBA Aktiengesellschaft, Basel (Schweiz)

Verfahren zur Herstellung von oxydierten Steroiden

Patentiert im Gebiet der Bundesrepublik Deutschland vom 17. August 1954 an

Patentanmeldung bekanntgemacht am 2. August 1956

Patenterteilung bekanntgemacht am 3. Januar 1957

Die Priorität der Anmeldungen in der Schweiz vom 21. August, 4. September 1953 und 24. März 1954
ist in Anspruch genommen

Gegenstand der Erfindung ist ein neues Verfahren zur Herstellung von Oxydationsprodukten der Steroidreihe, insbesondere zum Abbau der Seitenkette von Pregnanverbindungen und zur Herstellung von ungesättigten Verbindungen der Androstanreihe auf biochemischem Wege.

Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man auf gesättigte oder ungesättigte Androstane oder Pregnane, die in der 3- und der 17- bzw. in der 20-Stellung eine freie oder geschützte Oxy- oder Oxo-
gruppe aufweisen, Kulturen von *Fusarium solani*,
Fusarium caucasicum, *Rhizopus solinus*, *Venturia chlorospora* oder *Venturia linicerae* bzw. darin enthaltene Enzyme einwirken läßt.

Zur Kultur der genannten Pilze eignen sich die an sich hierfür bekannten Nährböden, z. B. solche mit Zuckern, wie Glucose oder Lactose, mit Peptonen, Maisquellwasser oder Sojaprodukten sowie mit Mineralsalzen, oder aber synthetische Nährlösungen. Man arbeitet insbesondere unter aeroben Bedingungen, beispielsweise in einer Schüttelkultur oder bei untergetauchtem Wachstum unter Rühren und Luftzufuhr. Die Eumyceten unterscheiden sich von anderen Mikroorganismen, z. B. den Bakterien, durch gutes Wachstum unter verhältnismäßig einfachen Zuchtbedingungen. Die verfahrensgemäße Reaktion findet in der beschriebenen Pilzkultur bzw. mit den darin enthaltenen, gegebenenfalls angereicherten oder ab-

Best Available Copy

getrennten Enzymen statt, im einfachsten Fall also in einer Aufschlammung des abgetrennten Pilzmyzels, des homogenisierten Pilzmyzels oder in dessen Filtraten bzw. wasserhaltigen Extrakten.

5 Als Ausgangsstoffe für das neue Verfahren verwendet man gesättigte oder ungesättigte Verbindungen der Pregnan- und Androstanreihe, z. B. Progesteron, 11-Dehydroprogesteron, 11-Ketoprogesteron, 11-, 12- oder 14-Oxyprogesterone, 5- oder 10 4-Pregnen-3-ol-20-one, 5-Pregnen-3, 20-diole, 11-Desoxycorticosteron, Corticosteron, 11-Dehydrocorticosteron, 4- oder 5-Androsten-3, 17-dion, Testosteron, 5-Androsten-3-ol-17-on, Adrenosteron, Pregnan-3, 20-dion, Pregnan-3-ol-20-on, Androstan-3, 17-dion, 15 Allopregnan-3, 20-dion, 3 β -Acetoxyallopregnan-20-on bzw. entsprechende Verbindungen mit geschützten Oxy- oder Oxogruppen. In den Ausgangsstoffen stellt die geschützte Oxygruppe z. B. eine mit einer aliphatischen, aromatischen oder heterocyclischen 20 Carbonsäure, beispielsweise Essigsäure, Propionsäure, Benzoesäure oder Furancarbonsäure, veresterte oder eine verätherte Oxygruppe dar, z. B. die Tetrahydropyranyloxy-, Benzyloxy- oder Triphenylmethoxygruppe. Die geschützte Oxogruppe ist vorteilhaft eine katalysierte Oxogruppe, abgeleitet insbesondere von einem zweiwertigen Alkohol, wie die Äthylendioxygruppe. Im übrigen können die Ausgangsstoffe Doppelbindungen enthalten, z. B. in 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9 (11)-, 11- oder 14-Stellung, oder 30 zusätzliche Substituenten aufweisen, wie freie oder geschützte Oxy-, Oxo- oder Carboxylgruppen, ferner Epoxygruppen oder Halogenatome, beispielsweise in 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 11-, 12-, 14-, 15- oder 21-Stellung. Die vorstehend genannten Ausgangsstoffe sind von 35 beliebiger sterischer Konfiguration. Das Verfahren läßt sich auch mit Gemischen durchführen, die einen oder mehrere der vorstehend genannten Ausgangsstoffe enthalten. So erhält man z. B., ausgehend von dem bei der Cholesterinoxidation gebildeten Neutralteil, insbesondere nach anschließender Dehydrierung der 3-ständigen Oxygruppe unter anderem das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion.

Die Abtrennung der Verfahrensprodukte läßt sich nach bekannten Methoden durchführen. Sie kann 45 z. B. durch Extraktion des Reaktionsgemisches mit einem organischen Lösungsmittel, z. B. Methylenchlorid oder Essigester, erfolgen. Für die weitere Reinigung des so erhaltenen Extraktes eignen sich besonders chromatographische Methoden, z. B. Adsorption an Aluminiumoxyd oder Silicagel, Anwendung von Verteilungsmethoden, z. B. dem Gegenstromverfahren, oder die Trennung mit den sogenannten »Girard-Reagenzien«, wie Trimethylammonium- oder Pyridinium-essigsäurehydrazid. 50 Anschließend an die Reinigung oder an ihrer Stelle wird schließlich vorzugsweise aus organischen oder wäßrigen organischen Lösungsmitteln umkristallisiert.

Mit dem neuen biochemischen Verfahren lassen sich z. B. das Progesteron wie auch das 5-Pregnen-3 β -ol-20-on, 11-Desoxycorticosteron oder 4-Androsten-3, 17-dion unter Verwendung z. B. von 60 *Fusarium solani* in nur einer Verfahrensstufe und mit hoher Ausbeute in das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion

überführen. Diese Umwandlung ist auf chemischem Wege nur in einem vielstufigen Verfahren mit wesentlich niedrigerer Gesamtausbeute möglich. Das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion stellt ein wichtiges Ausgangsmaterial für die Synthese des Oestrone dar, das daraus in einer einzigen Verfahrensstufe erhältlich ist. Aus den in der 4 (5)- und 5 (6)-Stellung gesättigten, in 3-Stellung eine freie oder geschützte Oxy- oder Oxo- 70 gruppe aufweisenden Pregnanverbindungen lassen sich je nach der Dauer der Bebrütung die entsprechenden gesättigten 17-Ketone oder deren im Ring A dehydrierten Derivate, beispielsweise die 1, 4-Androstadien-3, 17-dione gewinnen. Analog erhält man aus den entsprechenden gesättigten Androstanverbindungen deren im Ring A dehydrierten Abkömmlinge. Bei längerer Bebrütung wird aus Progesteron, aus dem 1, 4-Androstadien-3, 17-dion und 80 aus anderen genannten Ausgangsstoffen eine neue Verbindung, das 1, 2-Dehydrotestolacton vom F. = 219 bis 220° und der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{25} = -49 \pm 3^\circ$ (c = 1,025 in CHCl_3), erhalten. Dieses weist im Ultraviolettspektrum bei 242 m μ ebenfalls eine starke 85 Bande auf ($\log \epsilon = 4,23$) und enthält 75,70% Kohlenstoff und 8,05% Wasserstoff (berechnet für $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{O}_3$: C 75,97; H 8,05%). Mit anderen Pilzen, z. B. *Rhizopus sinuatus*, erhält man an Stelle dieser Verbindung auch das bekannte Testolacton.

Die Verfahrensprodukte können als Heilmittel oder als Zwischenprodukte zu deren Herstellung dienen. Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

41 einer Nährlösung, bestehend aus 30 cm³ Maisquellwasser, 50 g Pepton, 200 mg Rohglucose und Leitungswasser, werden gleichmäßig in 13 Erlenmeyerkolben je 11 Fassungsvermögen verteilt und sterilisiert. Das p_H dieser Lösungen beträgt 6,4. Sie werden mit einer Kultur des Pilzes *Fusarium solani* beimpft und bei 25° mechanisch geschüttelt. Nach 48 Stunden hat sich der Pilz stark vermehrt. Auf die 13 Erlenmeyerkolben verteilt man unter sterilen 105 Bedingungen eine Lösung aus 1 g Progesteron in 45 cm³ Aceton. Man schüttelt noch weitere 48 Stunden bei der vorstehend genannten Temperatur und filtriert dann vom Myzel ab. Das p_H des Kulturfiltrates beträgt jetzt 7,9.

Die Lösung wird einmal mit 1500 cm³, zweimal mit je 1000 cm³ und schließlich zweimal mit je 500 cm³ 110 Methylenchlorid ausgeschüttelt. Der Extrakt wird zweimal mit je 300 cm³ 0,1 n-Salzsäure, zweimal mit je 300 cm³ 1%iger Natriumbicarbonatlösung und 115 dreimal mit je 300 cm³ Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingedampft. Den teilweise kristallinen Rückstand (1,14 g) chromatographiert man an einer mit 30 g Aluminiumoxyd bereiteten Säule in einer Benzol-Petroläther-(6:4)-Lösung nach der Durchlaufmethode.

Die Benzol-Petroläther- und die Benzol-Eluat werden vereinigt und aus Aceton-Petroläther umkristallisiert. Man erhält papierchromatographisch einheitliche farblose, rhombische Platten vom F. = 145 125 bis 146°; $[\alpha]_D = +110^\circ \pm 4^\circ$ (CHCl_3), $+112^\circ \pm 4^\circ$

(Alkohol). Diese Verbindung stellt das bekannte 1, 4-Androstadien-3, 17-dion dar. Ausbeute etwa 80%.

- Wird an Stelle der Progesteronlösung eine Lösung aus 1 g 11-Desoxycorticosteron oder aus 1 g 4-Androsten-3, 17-dion in 45 cm³ Aceton einer entsprechenden Kultur von *Fusarium solani* zugesetzt, die Kultur in der oben beschriebenen Weise behandelt und aufgearbeitet, so erhält man das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion ebenfalls in hoher Ausbeute.
- Ersetzt man im obigen Beispiel die Kultur von *Fusarium solani* durch eine auf gleichem Nährboden hergestellte Kultur von *Fusarium caucasicum*, so wird Progesteron mit gleich hoher Ausbeute in 1, 4-Androstadien-3, 17-dion übergeführt.

Beispiel 2

- Zu 4 l einer Kultur von *Fusarium solani*, die, wie im Beispiel 1 beschrieben, hergestellt wurde, gibt man unter sterilen Bedingungen eine Lösung aus 1 g 5-Pregnen-3 β -ol-20-on in 37 cm³ Methanol. Die Kultur wird weitere 48 Stunden bei 26° geschüttelt, das Myzel darauf abfiltriert und das Kulturfiltrat, wie im Beispiel 1 beschrieben, mit Methylenchlorid extrahiert.
- Den Extraktionsrückstand chromatographiert man an einer mit 30 g Aluminiumoxyd bereiteten Säule in einer Benzol-Petroläther-(8:2)-Lösung nach der Durchlaufmethode. Die ersten Benzol-Petroläther-Fractionen werden vereinigt (etwa 140 mg) und aus Aceton-Petroläther umkristallisiert. Die erhaltenen rhombischen Platten vom F. = 145 bis 146° stellen das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion dar. Einzelne weitere Fractionen des Chromatogramms enthalten in kleiner Menge das 5-Androsten-3 β -ol-17-on.

Beispiel 3

- Eine Lösung aus 20 g des bei der Chromsäureoxydation des Cholesterylacetatdibromids gebildeten, entbromten, hydrolysierten und anschließend nach der Methode von Oppenauer dehydrierten Neutralteils in 700 cm³ Aceton gibt man zu 40 l einer Kultur von *Fusarium solani*, dargestellt nach Beispiel 1, in einem üblichen Kulturansatz unter Rühren und Belüften. Nach der im Beispiel 1 beschriebenen Bebrütung und Aufarbeitung gewinnt man 5,2 g 1, 4-Androstadien-3, 17-dion.

Beispiel 4

- Zu 4 l einer nach Beispiel 1 bereiteten Kultur von *Fusarium caucasicum* gibt man die Lösung aus 1 g 1, 4-Androstadien-3, 17-dion in 35 cm³ Aceton. Nach 7-tägiger Bebrütung wird, wie im Beispiel 1 beschrieben, aufgearbeitet und der erhaltene Extrakt nach der Entmischungsmethode gereinigt. Durch Umkristallisieren aus Aceton erhält man schließlich etwa 60% der neuen Verbindung 1, 2-Dehydrotestolacton vom F. = 219 bis 220° und der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{25} = -49 \pm 3^\circ$ ($c = 1,025$ in CHCl₃); Ultraviolett-spektrum: $\lambda_{max} = 242 m\mu$; $\log \epsilon = 4,23$. Mikroanalyse: C = 75,70, H = 8,05%.

Die gleiche Verbindung wird unter den Bedingungen des Beispiels 1 aus Progesteron, 5-Pregnen-3, 20-dion, 5-Pregnen-3 β -ol-20-on, 11-Desoxy-corti-

costeron oder 4-Androsten-3, 17-dion gewonnen, wenn man an Stelle von 2 Tagen 6 bis 10 Tage bebrütet.

Beispiel 5

Drei Erlenmeyerkolben von je 200 cm³ Fassungsvermögen, die je 50 cm³ der im Beispiel 1 beschriebenen sterilen Nährlösung enthalten, werden mit *Fusarium solani* beimpft und 48 Stunden bei 26° mechanisch geschüttelt. Dann gibt man zu jeder Kultur eine Lösung aus je 10 mg Allopregnan-3, 20-dion in 0,5 cm³ Aceton und schüttelt weiter bei 26°. Nach 24 und 48 Stunden sowie nach 7 Tagen wird je eine Kultur filtriert und, wie im Beispiel 1 beschrieben, extrahiert. Die drei Extraktionsrückstände 1 bis 3 werden papierchromatographisch untersucht. Die Extrakte 1 und 2 enthalten das Androsten-3, 17-dion, während im Extrakt 3 das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion vorhanden ist.

Ersetzt man im vorstehenden Beispiel das Allopregnan-3, 20-dion durch eine entsprechende 3 β -Acetoxy-allopregnan-20-on-lösung, so findet man in den Extrakten ebenfalls nach 24- bzw. 48stündiger Bebrütung das Androsten-3, 17-dion und nach 7-tägiger Bebrütung das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion. Ersetzt man im vorstehenden Beispiel das Allopregnan-3, 20-dion durch das Androsten-3, 17-dion, so findet man in den Extrakten nach 24- bzw. 48stündiger Bebrütung nur unverändertes Ausgangsmaterial und nach 7-tägiger Bebrütung das 1, 4-Androstadien-3, 17-dion.

Beispiel 6

4 l einer sogenannten Czapek-Dox-Nährlösung (Zusammensetzung: 2 g NaNO₃, 1 g K₂HPO₄, 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO₄, 0,02 g FeSO₄, 50 g Glucose in 1 l Wasser) werden gleichmäßig in zwei Schüttelgefäße verteilt, sterilisiert und mit einer Kultur des Pilzes *Rhizopus suinus* beimpft. Nach 2-tägigem Schütteln bei 26° hat sich der Pilz gut entwickelt, und man gibt unter sterilen Bedingungen in jedes Gefäß eine Lösung aus 500 mg 11-Desoxycorticosteron in 15 cm³ Aceton. Man schüttelt noch weitere 4 Tage bei der vorstehend beschriebenen Temperatur und filtriert dann vom Myzel ab. Das Kulturfiltrat wird wie beschrieben ausgeschüttelt und der Extrakt gewaschen, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand (1 g) wird im Gegenstromverfahren aufgetrennt. Dazu löst man ihn in 50 cm³ absolutem Äthanol und 150 cm³ Wasser und zieht mit 200 cm³ Benzol aus. Die untere Schicht wird abgetrennt und durchläuft vier weitere Scheidetrichter, die mit je 200 cm³ mit 25%igem Äthanol gesättigtem Benzol beschickt sind. Diese Prozedur wird viermal mit je 200 cm³ mit Benzol gesättigtem 25%igem Äthanol wiederholt, so daß schließlich fünf Benzol- und fünf wäßrige Alkohollösungen vorliegen. Sie werden im Vakuum eingedampft. Die papierchromatographische Untersuchung zeigt, daß in den wäßrig-alkoholischen Lösungen nur wenig hochpolare Nebenprodukte vorhanden sind, während die ersten drei Benzollösungen 650 mg einer Verbindung enthalten, die etwas höherpolar als das Ausgangsmaterial ist und kein Reduktionsvermögen besitzt. Durch Umkristallisieren aus

Acetonpetroläther erhält man das Testolacton in Nadeln vom F. = 203 bis 206°; $[\alpha]_D = +40^\circ$ (c = 1065 in Chloroform) Absorptionsbanden im Infrarot bei 5,81, 5,98 und 7,17 μ (Nujol = besonders

5 gereinigtes Paraffinöl).

Mikroanalyse für $C_{19}H_{28}O_3$:

berechnet C 75,46%, H 8,67%;
gefunden C 75,26%, H 8,80%.

10

Beispiel 7

Vier Erlenmeyerkolben von je 200 cm³ Fassungsvermögen, die je 50 cm³ der im Beispiel 1 beschriebenen sterilen Nährlösung enthalten, werden mit 15 *Fusarium solani* beimpft und 48 Stunden bei 26° mechanisch geschüttelt. Dann trennt man das Myzel der vier Kulturen einzeln ab und wäscht es mit Wasser. Die Myzele von zwei Kulturen werden direkt in zwei Erlenmeyerkolben in je 50 cm³ destilliertem Wasser 20 suspendiert, während die andern zwei Myzele einzeln zuerst in einem Homogenisator mit 50 cm³ destilliertem Wasser zerkleinert und erst dann in je einen Erlenmeyerkolben übergeführt werden. Zu den zwei Myzelauflösungen und den zwei Mycelhomogenaten 25 gibt man je eine Lösung von 10 mg Progesteron in 0,5 cm³ Aceton und läßt die mit Watte verschlossenen Erlenmeyerkolben bei 26° mechanisch schütteln. Nach 36 Stunden werden eine Myzelauflösung und ein Mycelhomogenat 30 und, wie im Beispiel 1 beschrieben, extrahiert. Die papierchromatographische Untersuchung zeigt, daß die Extraktionsrückstände neben wenig Progesteron zur Hauptsache 1,4-Androstadien-3,17-dion enthalten. Nach 7 Tagen werden die zweite Myzel- 35 suspension und das zweite Mycelhomogenat in gleicher Weise aufgearbeitet und untersucht. In den so erhaltenen Extrakten ist einzig 1,2-Dehydrotestolacton vorhanden.

Beispiel 8

40

Wird im Beispiel 6 an Stelle der Kultur von *Rhizopus suinus* eine solche von *Venturia chlorospora*

oder *Venturia liniceræ* verwendet und wird im übrigen 11-Desoxycorticosteron in gleicher Weise inkubiert, so erhält man nach analoger Aufarbeitung 45 Testolacton vom F. = 203 bis 206°.

PATENTANSPRÜCHE:

50

1. Verfahren zur Herstellung von oxydierten Steroiden durch Bebrütung der zu oxydierenden Steroide mit einer Kultur eines niederen Pilzes oder den daraus erhältlichen Enzymen und Abtrennung der Oxydationsprodukte, dadurch gekennzeichnet, daß man Androstane oder Pregnane, die in 3- und 17- bzw. in 20-Stellung eine freie oder geschützte Oxy- oder Oxogruppe enthalten, mit Kulturen von *Fusarium solani*, *Fusarium caucasicum*, *Rhizopus suinus*, *Venturia chlorospora* oder *Venturia liniceræ* biologisch oxydiert. 55

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Pregnan- oder Androstanreihe mit einer 4(5)- oder 5(6)-ständigen Doppelbindung, insbesondere Progesteron, 5-Pregnen-3 β -ol-20-on, 11-Desoxycorticosteron, 4-Androsten-3,17-dion, 5-Androsten-3 β -ol-17-on, ferner den bei der Chromsäureoxydation des Cholesterylacetatdibromids gebildeten, entbromierten, hydrolysierten und anschließend nach 60 der Methode von Oppenauer dehydrierten Neutralteil sowie Allopregnan-3,20-dion oder 3 β -Acetoxy-allopregnan-20-on als Ausgangsstoffe verwendet. 70

3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß man die Kultur des Pilzes bzw. darin enthaltene Enzyme 1 bis 2 Tage oder 6 bis 15 Tage auf das Ausgangsteroid einwirken läßt. 75

80

In Betracht gezogene Druckschriften:

USA.-Patentschrift Nr. 2 602 769;
Experientia, Bd. 8, 1952, S. 422;
Research (London), Bd. 6, 1953, S. 309.

Best Available Copy